

克拉霉素联合地塞米松对肺炎支原体感染小鼠干扰素- γ 、白介素-4 表达的影响

马玉龙¹, 郭 康², 邓保国¹, 温小军^{3*}

(1. 新乡医学院 微生物学教研室, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院第三附属医院 肿瘤内二科, 河南 新乡 453003; 3. 贵阳医学院 生物学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 研究克拉霉素联合地塞米松对肺炎支原体(MP)感染小鼠干扰素- γ (IFN- γ)和白介素-4(IL-4)的影响。方法: 用MP菌液建立肺炎支原体小鼠模型, 将造模成功的小鼠分为模型对照组、克拉霉素组、联合干预组和地塞米松组, 每组18只, 分别注射5%生理盐水、克拉霉素、克拉霉素联合地塞米松以及地塞米松进行干预; 测定并比较各组小鼠肺组织病理评分以及干预后第3、5及8天肺泡灌洗液IFN- γ 、IL-4的含量。结果: 联合干预组各时点肺组织病理学评分均较低, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 克拉霉素组第3天肺组织病理学评分较高, 第5天后明显下降; 不同组别各时间点肺泡灌洗液IFN- γ 、IL-4比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 第3天联合干预组IFN- γ 含量最低, 第5和第8天各治疗组IFN- γ 含量均升高, 联合干预组与克拉霉素组、模型对照组IFN- γ 比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 联合干预组IL-4含量降低, 与模型对照组及地塞米松组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 克拉霉素联合地塞米松治疗可降低MP感染小鼠IL-4的水平, 升高IFN- γ 水平, 调节免疫反应。

[关键词] 克拉霉素; 地塞米松; 肺炎, 支原体; 干扰素- γ ; 白介素-4

[中图分类号] R375.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2014)04-0552-04

Effect of Clarithromycin Combined Dexamethasone on the Levels of IFN- γ and IL-4 in Rats with Mycoplasma Pneumoniae Infection

MA Yulong¹, GUO Kang², DENG Baoguo¹, WEN Xiaojun³

(1. Department of Microbiology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China; 2. Department of Medical Oncology, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China; 3. Department of Biology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of clarithromycin combined dexamethasone on the levels of interferon- γ (IFN- γ) and IL-4 in rats with mycoplasma pneumoniae (MP) infection. **Methods:** MP bacterial liquid was adopted to establish MP infection rat model, and successful ones were randomly divided into four groups: control group (group C), clarithromycin intervened group (group CI), dexamethasone intervened group (group DI), and clarithromycin combined with dexamethasone group (group CD). Rats in the four groups received different intervention. Pathological scores of lung tissues and levels of IFN- γ and IL-4 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in the 3rd, 5th, 8th day after intervention were measured. **Results:** Pathological scores of lung tissues of rats in group CD were lower at different time points, the difference among different time points was not statistically significant, ($P > 0.05$); Pathological scores of lung tissues of rats in group CI were higher in the 3rd day, decreased obviously after the 5th day; there were statistical significance in IFN- γ and IL-4 levels in BALF among different groups and different time points ($P < 0.05$); The IFN- γ levels were lowest in the 3rd day in group CD and were increased in each treatment group in the 5th, 8th day, and there were statistical

* 通信作者 E-mail: 2547285543@qq.com

网络出版时间: 2014-08-14 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20140814.2246.071.html>

differences between group CD and group C, group CI ($P < 0.05$). The IL-4 levels in group CD were decreased as compared with group C and group CI, there were statistical significance ($P < 0.05$).

Conclusion: Clarithromycin combined dexamethasone can significantly reduce the level of IL-4, increase levels of IFN- γ , and regulate the immune response.

[Key words] clarithromycin; dexamethasone; mycoplasma pneumoniae; interferon- γ ; interleukin-4

肺炎支原体 (mycoplasma pneumoniae, MP) 是小儿急性呼吸道感染的病原菌之一^[1]。MP 是原核细胞型微生物,其结构缺乏细胞壁,对作用于细胞壁的抗生素耐药,而对抑制微生物蛋白质合成的大环内酯类抗生素敏感。MP 细胞膜脂抗原与多种宿主细胞有共同的抗原成分,感染宿主后与宿主免疫系统相互作用,可产生广泛的免疫反应,在肺炎支原体肺炎 (mycoplasma pneumoniae pneumonia, MPP) 发生中起着重要作用。近年来,由于大环内酯类抗生素广泛应用,MP 耐药性也变得越来越严重。糖皮质激素具有抑制细胞免疫反应,抑制免疫因子及趋化因子产生的作用,从而减轻全身炎症反应^[2]。本研究建立 MP 感染 BALB/C 小鼠模型,使用药物克雷霉素和地塞米松治疗处理小鼠,通过不同时间点干扰素- γ (IFN- γ) 和白介素-4 (IL-4) 的动态检测,了解其免疫应答情况,为进一步研究 MP 感染的发病机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂及分组

选用 BALB/C 小鼠 72 只,由郑州大学医学院实验动物中心提供,实验动物许可证编号 SCXK (豫)2010-0002,雌雄各半。6 周左右,体重 (18.2 \pm 2.7) g,分笼饲养。MP 菌株为新乡医学院保存菌株,小鼠 IFN- γ 、IL-4 酶联免疫分析 (ELISA) 试剂盒购自南京凯基生物有限公司。72 只小鼠随机分为模型对照组、克拉霉素组、联合干预组和地塞米松组,每组各 18 只。

1.2 动物模型制备

将小鼠放于清洁动物室饲养,体积分数 10% 水合氯醛 0.05 mL 腹腔注射麻醉小鼠,将小鼠头后仰 45 $^{\circ}$,用 0.02 mL 的 10^8 ccu/mL MP 菌液滴鼻接种,分离培养。MP 感染小鼠全部存活,精神状态差,竖毛寒战、咳嗽、口鼻分泌物增多,进食及活动少,大便稀,咽拭子 PCR 检测结果 MP 阳性,提示建模成功。MP 感染模型建立成功 1 d 后,进行 7 d 的治疗干预。克拉霉素组每天皮下注射克拉霉素

25 mg/kg 1 次,地塞米松组每日腹腔注射地塞米松 0.5 mg/kg 1 次,联合干预组每天皮下注射克拉霉素 25 mg/kg,并腹腔注射地塞米松 0.5 mg/kg 各 1 次。克拉霉素及地塞米松以 5% 的生理盐水配制,模型对照组注射同剂量 5% 生理盐水^[3]。

1.3 观察指标

肺组织病理学评分:用药后第 3、5、8 天后分批处死 (每次 6 只) 各组小鼠,采集肺泡灌洗液和肺组织,气管插管;用 0.5 mL 生理盐水对肺组织灌洗 3 次,每次灌洗后收集灌洗液,采用盲法对肺组织病理学进行评分,具体评分标准参照文献进行评分^[4]。肺泡灌洗液中细胞因子测定:用 ELISA 试剂盒测定各组大鼠 IFN- γ 、IL-4 含量,按照说明书操作,酶标仪测 OD 值,通过标准曲线计算小鼠 IFN- γ 、IL-4 浓度。

1.4 统计学分析

数据分析采用 SPSS 19.0,所有数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,正态分布多组间比较采用单因素方差分析,非正态分布采用秩和检验。两两比较采用 LSD 检验,不齐采用秩和检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况及肺组织病理评分

模型对照组小鼠从第 3 天开始出现较为明显症状,被毛蓬乱、精神状态差,体重无明显变化。克拉霉素、联合干预组及地塞米松组小鼠均见不同程度的精神萎靡,活动量减少,饮食饮水减少。4 组小鼠各时点肺组织病理学评分比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。各治疗组各时间点肺组织病理学评分均小于模型对照组,联合干预组肺组织评分最低,克拉霉素组第 3 天肺组织病理学评分较高,第 5 天明显下降;地塞米松组第 3 天肺组织病理评分明显降低。联合干预组不同时间点肺组织病理学评分均较低,组内比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 4 组小鼠各时点肺组织病理评分($\bar{x} \pm s$, 分)
Tab. 1 Pathological scores of lung tissues of rats in different groups at different time points

组别	第 3 天	第 5 天	第 8 天	<i>F</i>	<i>P</i>
模型对照组	15.33 ± 0.52	11.83 ± 0.75	14.17 ± 0.75	40.83	0.00
克拉霉素组	10.67 ± 0.82	8.17 ± 0.75	7.50 ± 0.84	25.95	0.00
联合干预组	6.67 ± 1.03	6.83 ± 0.75	6.00 ± 0.89	1.43	0.28
地塞米松组	7.67 ± 1.03	12.50 ± 1.05	10.17 ± 0.75	38.47	0.00
<i>F</i>	118.47	65.39	116.86		
<i>P</i>	0.00	0.00	0.00		

2.2 肺泡灌洗液 IFN- γ 、IL-4 含量

各组小鼠不同时间点肺泡灌洗液 IFN- γ 、IL-4 比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。模型对照

组第 3 天时 IFN- γ 含量最高,随后降低;模型对照组 IL-4 随着时间增加,含量逐渐增高;地塞米松组不同时间点 IFN- γ 差异无统计学意义($P > 0.05$), IL-4 第 3 天与第 5、8 天相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$);联合干预组第 3 天 IFN- γ 含量最低;第 5、8 天各治疗组 IFN- γ 含量均升高,不同时间点联合干预组 IFN- γ 含量与其他 3 组对应时间点的含量比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$);联合干预组 IL-4 含量各时间点均降低,与模型对照组及地塞米松组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 4 组小鼠各时点肺泡灌洗液细胞因子 IFN- γ 、IL-4 含量($\bar{x} \pm s$)
Tab. 2 IFN- γ and IL-4 levels in BALF of rats in different groups at different time point

组别	IFN- γ (ng/L)			IL-4 (ng/L)		
	第 3 天	第 5 天	第 8 天	第 3 天	第 5 天	第 8 天
模型对照组	185.50 ± 5.89	177.17 ± 7.00	176.67 ± 3.93	65.67 ± 8.45	75.67 ± 3.56	75.50 ± 3.27
克拉霉素组	171.83 ± 4.07	186.17 ± 3.06	179.33 ± 3.72	44.00 ± 1.41	45.67 ± 3.56	44.67 ± 2.80
联合干预组	155.17 ± 3.43 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	188.00 ± 2.76 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	185.33 ± 1.97 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	43.67 ± 1.96 ⁽¹⁾⁽³⁾	44.00 ± 0.89 ⁽¹⁾⁽³⁾	43.33 ± 1.37 ⁽¹⁾⁽³⁾
地塞米松组	179.50 ± 5.43	180.00 ± 4.05	178.50 ± 6.06	59.50 ± 1.52	74.66 ± 3.72	74.00 ± 3.35
<i>F</i>	44.77	7.57	4.83	37.23	179.02	239.64
<i>P</i>	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00

⁽¹⁾与模型对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与克拉霉素组比较, $P < 0.05$; ⁽³⁾与地塞米松组比较, $P < 0.05$

3 讨论

支原体肺炎是由 MP 感染引起的急性呼吸道感染性疾病,对于 MP 肺炎在发病机制,一般动物模型与人类的感染有一定相似性,因此建立 MP 动物模型对研究 MP 致病机理,及其对免疫系统影响有一定参考价值^[5]。本研究采用 BALB/C 小鼠建立 MP 感染模型,研究 MP 感染后克拉霉素加用地塞米松对机体免疫反应的影响。

细胞因子是免疫细胞产生的一大类能在细胞间传递信息,具有免疫调节,参与炎症损伤等效应功能的蛋白质或小分子多肽^[6]。关于 MP 致病机制的研究,目前认为不仅与体液免疫有关,还与细胞免疫有关,且很多细胞因子都参与了 MP 感染,细胞因子水平在不同患者及感染后不同时期均不同^[7]。BALB/C 小鼠对肺炎支原体较为敏感,属近交系,可保证实验反应稳定性。大环内酯类抗生素,如克拉霉素,通常是 MP 感染治疗的首选药物^[8]。随着抗生素广泛使用,一些耐药菌的出现使得单纯大环内酯类药物治疗效果并不显著,而糖皮质激素具有抑制细胞免疫反应,抑制免疫因子及趋化因子产生的作用,从而能减轻全身炎症反应。

本研究发现模型对照组小鼠不同时点肺组织病理学评分均较高,各治疗组各时间点肺组织病理学评分均小于模型对照组,提示克拉霉素、地塞米松均能显著减轻肺组织损伤;联合干预组评分最低,说明糖皮质激素地塞米松与大环内酯类克拉霉素联合使用对于 MP 感染可能存在协同作用;地塞米松组第 3 天肺组织病理评分明显降低,之后单用地塞米松对肺组织炎症无明显效果,单用克拉霉素或联合治疗组效果显著,这与以往研究结果一致^[9]。

IFN- γ 与 IL-4 是 Th1、Th2 特征性细胞因子, IFN- γ 作为辅助细胞免疫应答细胞因子,通过上调细胞内 Bax 表达,抑制纤维细胞增生及胶原合成,促进纤维细胞凋亡和受损肺泡修复^[10]; IFN- γ 还能活化中性粒细胞、NK 细胞,刺激血管内皮细胞和白细胞合成的黏附分子,促进 Th1 细胞发育和抑制 Th2 细胞活化与增殖。IL-4 辅助体液免疫应答,正常情况下维持机体免疫平衡。IL-4 作为抗炎性细胞因子,对 Th2 类细胞因子的产生和淋巴细胞及巨噬细胞发挥免疫调节作用,可使免疫系统向 Th2 依赖的过敏反应方向发展^[11]。本研究通过监测不同时点 IFN- γ 和 IL-4,发现模型对照组第 3 天 IFN- γ 含量最高,之后逐渐降低,即 MP 感染急性期产生

较多的 IFN- γ ,随后降低,提示 MP 感染能抑制 IFN- γ 的表达导致免疫失衡;其余各组随着药物干预时间延长,IFN- γ 含量逐渐增高,IL-4 含量逐渐降低,IL-4 对判断 MP 病情轻重有重要意义,增高越多,病情越重,克拉霉素及克拉霉素与地塞米松联合干预均能促进 MP 模型小鼠 IFN- γ 表达、抑制 IL-4 表达,提示克拉霉素及联合干预均有抑制 Th2 细胞亚群优势和调节免疫反应的作用。

综上所述,地塞米松联合克拉霉素应用于 MP 感染,可显著降低 IL-4 的水平,升高 IFN- γ 水平,抑制 Th2 细胞亚群、调节免疫反应。

4 参考文献

[1] 周建林,苏成安. 新生儿支原体肺炎血清心肌酶和肌钙蛋白 I 水平检测[J]. 贵阳医学院学报, 2013(5):512-514.
[2] 丁圣刚,王建,王亚亨,等. 糖皮质激素在治疗儿童重症肺炎支原体肺炎(MPP)中的价值[J]. 复旦学报:医学版, 2012(2):180-183.
[3] Tagliabue C, Salvatore CM, Techasaensiri C, et al. The impact of steroids given with macrolide therapy on experimental *Mycoplasma pneumoniae* respiratory infection[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2008(8): 1180-1188.
[4] 刘晓红,辛德莉,候安存,等. 小鼠肺炎支原体肺炎模型

的建立及肺组织病理学评分方法的应用[J]. 重庆医学, 2004(9):1338-1340.
[5] 黄晓红,龚铭,李桃,等. 肺炎支原体感染大鼠模型的建立及治疗研究[J]. 南方医科大学学报, 2009(11): 2219-2221.
[6] 李素云,李亚,李建生,等. 毒素清颗粒对支原体肺炎老龄大鼠免疫功能和细胞因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012(21):222-225.
[7] 曹博淦. 克拉霉素对小鼠肺炎支原体感染模型 IL-6、IFN- γ 、IL-5 水平的影响[J]. 广西医学, 2013(10): 1314-1316.
[8] Tagliabue C, Techasaensiri C, Torres JP, et al. Efficacy of increasing dosages of clarithromycin for treatment of experimental *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011(10): 2323-2329.
[9] 王志华,王玉水,刘艳. 地塞米松对肺炎支原体感染大鼠血清及肺泡灌洗液中 IL-12、IL-13 的影响[J]. 临床儿科杂志, 32(3):265-270.
[10] 王玉水,王志华. 肺炎支原体大鼠肺泡灌洗液 IFN- γ 的变化[C]. 第 5 届全国中西医结合变态反应学术会议论文集, 20-21.
[11] 康妍萌,丁明杰,韩玉玲. 细胞因子与肺炎支原体感染的相关研究进展[J]. 山东医药, 2011(21):113-114.
(2014-05-26 收稿,2014-07-10 修回)

中文编辑: 文箴颖; 英文编辑: 周 凌

(上接第 551 页)

组,提示可能还有其他转录因子共同参与 COPD 的病理生理过程。本研究还发现,激素治疗组 NF- κ B 激活被抑制和 MCP-1 表达水平明显低于茶碱治疗组,表明肾上腺皮质激素的抗炎作用及抑制 NF- κ B 的调控基因作用强于茶碱类药物。

综上所述,NF- κ B 基因及其调控蛋白 MCP-1 的表达参与了 COPD 气道炎症的发病机制,激素或茶碱可干预其发病过程,延缓 COPD 的发展,从而为 COPD 的治疗开辟新途径,但并非唯一途径。因此,从多个环节上阻断这条转导途径对 COPD 的治疗有着重要的临床意义。

4 参考文献

[1] Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Clin Chest Med*, 2014(1):71-86.
[2] Zhang Y, Lin X, Koga K, et al. Strain differences in alveolar neutrophil infiltration and macrophage phenotypes in an acute lung inflammation model[J]. *Mol Med*, 2011(7-8):780-789.
[3] Patryk S, Ann J, Crowther L, et al. The effect of smoking on the transcriptional regulation of lung inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J].

Am J Respir Crit Care Med, 2006(1): 41-50.
[4] Rastrick JM, Stevenson CS, Eltom S, et al. Cigarette smoke induced airway inflammation is independent of NF- κ B signalling[J]. *PLoS One*, 2013(1):54128.
[5] Yao H, Rahman I. Current concepts on oxidative/carbon-yl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Oxicol Appl Pharmacol*, 2011(2):72-85.
[6] Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions[J]. *Genes Dev*, 2012(3):203-234.
[7] Kolattukudy PE, Niu J. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway[J]. *Circ Res*, 2012(1):174-189.
[8] 王慧,张永,程德云. 泼尼松对 MCP-1 及 IL-8 在 COPD 大鼠气道表达的影响[J]. 西部医学, 2009(8):1273-1276.
[9] Gartlehner G, Hansen RA, Carson SS, et al. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids in patients with COPD: a systematic review and meta-analysis of health outcomes[J]. *Ann Fam Med*, 2006(3):253-262.
[10] 杨国辉,席学莉,闻心培. 沙美特罗替卡松对哮喘患者核因子- κ B 调控单核细胞化学蛋白-1 表达的影响[J]. 中国综合临床, 2009(5):499-501.

(2014-06-24 收稿,2014-07-11 修回)

中文编辑: 文箴颖; 英文编辑: 周 凌